

Studies on Isopentenyl Pyrophosphate
Isomerase, Farnesyl Pyrophosphate Synthetase
and Squalene Synthetase with Modified
Substrates. (修飾基質によるインペンテニルピロ
リン酸異性化酵素, ファルネシルピロリン酸合成酵
素およびスクワレン合成酵素の研究)

著者	古山 種俊
号	341
発行年	1973
URL	http://hdl.handle.net/10097/23705

DISCUSSIONS
EXPERIMENTAL

Chapter III. Isopentenyl Pyrophosphate Isomerase Reaction with
Modified Substrates
RESULTS

- §1. Substrate Specificity with Respect to 3-Alkyl-3-butenyl
Pyrophosphates
- §2. Enzymatic Reaction of 3-Ethyl-3-butenyl Pyrophosphate
- §3. Stereochemistry of the Isomerization of Isopentenyl
Pyrophosphate to Dimethylallyl Pyrophosphate
- §4. Interrelation of the Isopentenyl Pyrophosphate Homologs
in the Enzymatic Isomerization

DISCUSSIONS
EXPERIMENTAL

Chapter IV. Substrate Specificity of Squalene Synthetase
RESULTS

DISCUSSIONS
EXPERIMENTAL

SUMMARY

REFERENCES

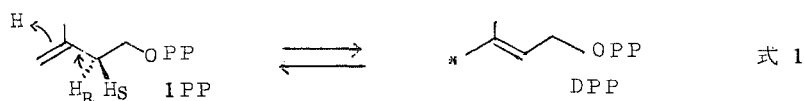
ACKNOWLEDGEMENTS

論文内容要旨

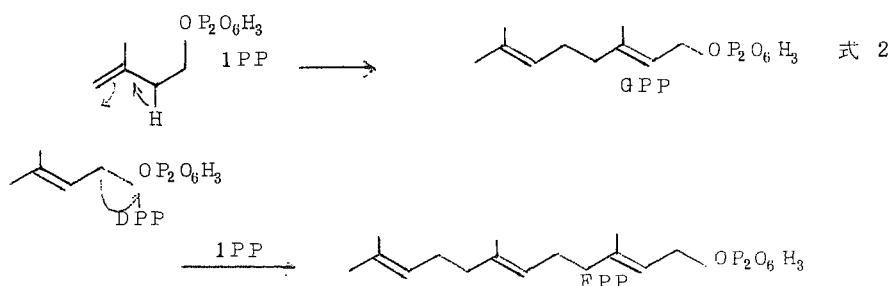
緒 論

Isopentenyl pyrophosphate isomerase, farnesyl pyrophosphate synthetase および squalene synthetase はイソプレノイド化合物における基本的な過程である炭素鎖延長反応に関与する一連の酵素であり、式1～3に示す反応をそれぞれ触媒する。

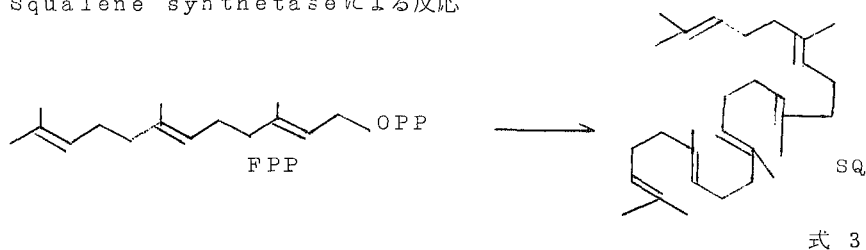
式1: Isopentenyl pyrophosphate isomerase による反応



式2: Farnesyl pyrophosphate synthetase による反応



式3: Squalene synthetase による反応



式1,2で示される酵素反応は isopentenyl pyrophosphate (IPP) が双方とも同様の立体特異性をもって反応にあづかるという類似点がある。また、式2,3で示される、いわゆる "head to tail" または "tail to tail" の炭素鎖延長反応は有機化学的にも興味深い炭素-炭素結合を生じさせる反応である。

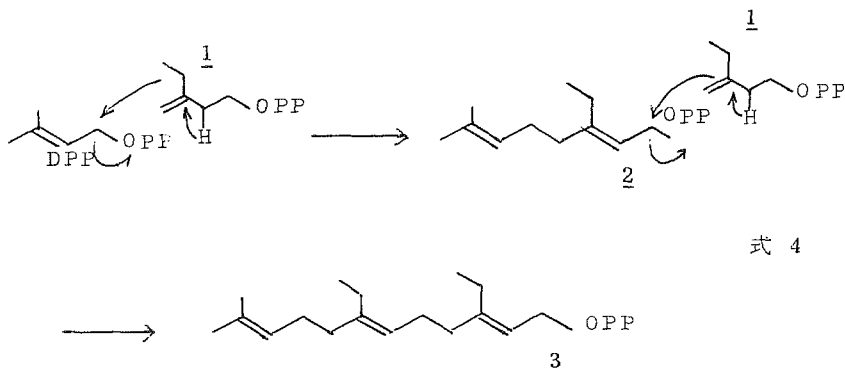
著者は、これらの興味ある酵素反応機構に対する知見を得る目的で基質類似体を合成し、基質特異性の面から反応機構を検討した。farnesyl pyrophosphate synthetase につい

てはアリル性の基質を用いた基質特異性の研究がなされているが、他の二者についての基質特異性に関する研究はまったくなされていなかった。

第一章 Farnesyl Pyrophosphate Synthetase の基質特異性

Isopentenyl Pyrophosphate Homolog について

アリル性の基質 [dimethylallyl pyrophosphate (DPP), geranyl pyrophosphate (GPP)] に関するこの酵素の基質特異性はかなりゆるいことが知られているが、非アリル性の基質、IPP に関するそれは何も知見がない。そこで IPP の C-3 位のメチル基に関するホモログ、3-alkyl-3-butenyl pyrophosphate を 4 種合成し、これらの反応性をブタ肝臓より抽出した酵素を用いて検討した。その結果 IPP のメチル基をエチル基に変えた 3-ethyl-3-butenyl pyrophosphate (1) は IPP に代って DPP, GPP と酵素的に縮合するが、さらに大きなアルキル基 (*n*-プロピル, *n*-ブチル) を持ったものやメチル基を水素に変えたものは、まったく反応しないことがわかった。又、(1) は本来の基質、IPP とまったく同様に縮合して、生成物はすべてトランス体を与えることが明らかになった。DPP と (1) との酵素反応は式 1 のようになる。

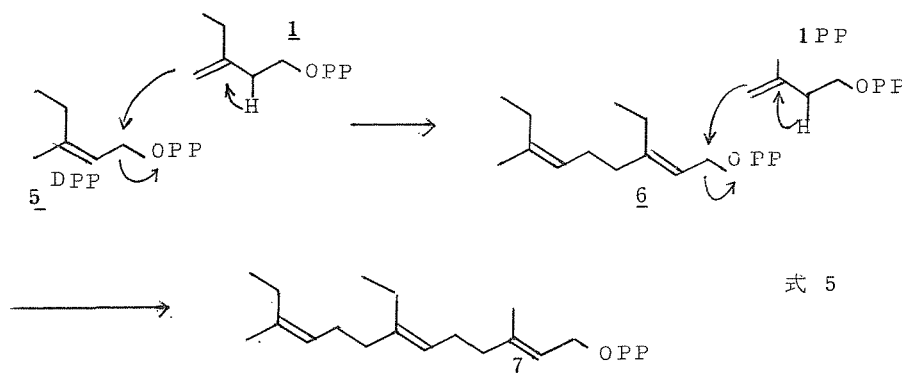


trans-3-methyl-3-pentenyl pyrophosphate (4) も IPP に代って farnesyl pyrophosphate synthetase の基質となり、DPP, GPP と縮合することがわかった。(1), (4) の二種の基質ホモログの反応性の比較をした結果、DPP との縮合反応において (1) との反応は非常に遅く、その生成物は圧倒的に farnesyl pyrophosphate (FPP) のホモログ (3) であるのに対し、(4) と DPP との縮合では GPP のホモログの段階でかなり蓄積していることがわかった。また、GPP との縮合反応における (1) と (4) の K_m 値を求めると (1) は (4) の約 2 倍の値を示した。これらの結果から farnesyl pyrophosphate synthetase には DPP が反応するところと GPP が反応するところの二つの別な活性部位が存在することがさらに明らかとなり、それぞれの活性部位における IPP の結合部位は DPP, GPP に対するそれとは異なった性質のもので、IPP のメチル基に対しても重要な結合部位が存在するものと考えられる。

第二章 昆虫の幼若ホルモンの炭素骨格を持つ Bishomofarnesyl

pyrophosphate の酵素的合成

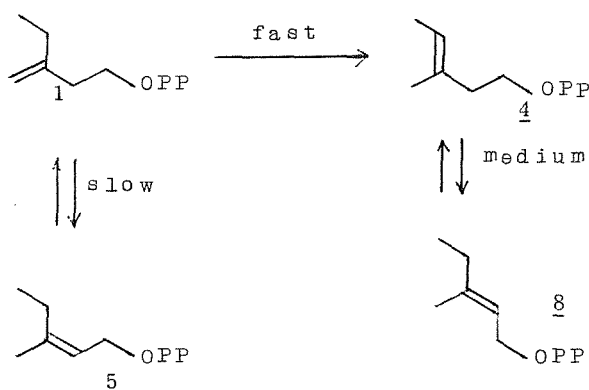
Farnesyl pyrophosphate synthetase の基質特異性に関して得られた知見を利用して昆虫の幼若ホルモンの炭素骨格を持つ FPP のホモログ [bishomofarnesyl pyrophosphate (7)] を酵素的に合成することを目的とした。3-methyl-2-pentenyl pyrophosphate (5) と (1) との基質ホモログ同志の縮合もこの酵素により触媒され、トランス体の bishomogeranyl pyrophosphate (6) を生成することが明らかになった。この反応液にさらに IPP を添加して酵素反応を続行することにより目的とする (7) が生成した。蚕のホモジネート中にもこの酵素が存在することも確認できたことから、昆虫における幼若ホルモンの生合成において、そのエチル基の由来に対する一つの可能性として、(1) がその前駆体となっていることが示唆された。



第三章 修飾基質による Isopentenyl Pyrophosphate Isomerase 反応

基質ホモログ、3-alkyl-3-butenyl pyrophosphate に関する isopentenyl pyrophosphate isomerase の基質特異性を間接的方法にて検討したところ、IPP の C-3 位のメチル基をエチル、n-プロピル、および n-ブチル基に変えたホモログはこの酵素により触媒され、アリル性のピロリン酸エステルに異性化することがわかった。もっとも反応性の高い (1) について詳しくこの酵素による異性化反応を追求した。isopentenyl pyrophosphate isomerase 反応により新しく生ずる二重結合に関する geometry は farnesyl pyrophosphate synthetase のそれとまったく同様であることが知られているので、(1) が反応した場合、反応生成物はシス体 (5) が得られることが予想され、第二章で述べた幼若ホルモンの生合成との関連においても興味深いものであったが、(1) の反応生成物は意外なことに、三種の異性体を与え、かつ、非アリル性化合物 (4) が主生成物であった。また、トランス体 (8) がこれにつき、予想された (5) の生成は最も少なかった。また (4) のシス異性体は全く生成していないことがわかった。これらの意外な結果は IPP と DPP の異性化反応の Stereochemistry が精製酵素についても正しいかどうかを疑わしめた。そこで、これを直接的に証明するため、IPP を精製酵素と重水中でインキュベートし得られた DPP にとり込まれている重水素の位置を調べたところ、 $-\text{CH}_2$

OP₂O₆⁸⁻基に対してトランスのメチル基のみに重水素がとり込まれていることがわかった。すなわち、(4)の生成から示唆されるrandomizationは本来の基質、IPPについてはまったく起っていないことが確認された。したがってここに得られた(1)の酵素反応の異常な結果は、基質のわずかな構造修飾もたらしたものと結論される。これらの異性体の酵素反応における相互関係を検討したところ、式6のような関係があることがわかった。すなわち、(1)の主反応は(4)への異常な非可



式 6

逆的異性化であり、(5)への正常な異性化は非常に遅い。一方、(4)は異常反応を起さず、(8)へ可逆的に異性化される。これらの興味深い結果から、isopentenyl pyrophosphate isomeraseの活性部位には、ピロリン酸基に対するもののほかにメチル基に対する重要な結合部位が存在することが示唆された。

第四章 Squalene Synthetase の基質特異性

Farnesyl pyrophosphate synthetaseの基質特異性を利用して、約15種のFPPのホモログを酵素的に合成し、ブタ肝臓のミクロゾーム画分とインキュベートしてsqualene synthetaseによるtail to tailの縮合の基質特異性を検討した。その結果、squalene ビスホモ体、テトラホモ体、テトラヒドロ体、ビスノルテトラヒドロ体がかなり効率よく対応するFPPのホモログより酵素的に生成してくることがわかった。基質の構造の比較からFPPのピロリン酸に近い部分のアルキル基に関してsqualene synthetaseは厳しい特異性を示すが、FPPの末端の二重結合やメチル基に関してはややゆるい特異性をもっていることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

表題の三種の酵素はイソプレノイド化合物の生合成における炭素鎖延長反応に関与する一連の酵素であり、テルペン類、カロチノイド、ステロイド等の生合成に重要な役割を果たしている。これまでファルネシルピロリン酸合成酵素において、アリル側の基質特異性については詳細な研究がなされているが、その他については、まだ十分な研究がない。これに著者は着目して本問題をとりあげた。第1章においてはファルネシルピロリン酸合成酵素反応の非アリル側基質の特異性を検討し、これがアリル側基質の場合と異り特異性に対する制限がきびしく、正常な基質の場合のメチル基をエチル基にかえたものは反応にあずかるけれども、水素とか、プロピル基以上の大きさのアルキル基でおきかえたものは反応しないこと、およびエチル基の場合の反応様式もふくめて、反応する時の附加の立体化学は、トランス型であることを証明した。

次に、その異性体を合成し、その反応速度を前者と比較して酵素上での反応様式について考察した。

第2章においては既知の知見と第1章にえられた知見を組合わせて、酵素反応を行ない、昆虫幼若ホルモンの炭素骨格ビスホモファルネソールを酵素的に合成することに成功し、又蚕のホモジネート中にもこの酵素の存在することを確認して、このホルモンの生体内における合成経路について重要な示唆をえた。

第3章においてはイソペンテニルピロリン酸異性化酵素の反応をイソペンテニルピロリン酸のホモ体を用いて検討し、ホモ体の場合には正常基質の場合と異なる方向に進行することを明らかにした。

第4章においてはスクワレン合成酵素の反応性について、本論文の先の部でえられた化合物等を駆使してファルネシルピロリン酸類似体をえらび出しそれらの反応性を検討した。その結果、反応の可否を決定する要素としてtail to tail結合にあづかる附近の構造が最も重要であること、また、炭化水素側の大きさが問題であること、端の二重結合は無関係であること等、極めて注目すべき知見をえた。

以上のべたように本研究はイソプレノイド生合成の種々の面を深くほり下げたものであり、明確な多数の新知見をえて、酵素レベルでの生合成研究の分野に貢献する所大である。

よって古山種俊提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。